

# Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie

8. Jahrgang

November 1970

Heft 6 (S. 545—660)

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
8. Jg., S. 545—551, November 1970

## Organophosphat-Inhibitoren als Werkzeuge des Enzymologen<sup>1)</sup>

Von K. KRISCH

*Aus dem Institut für Physiologische Chemie und Physikochemie der Universität Kiel*

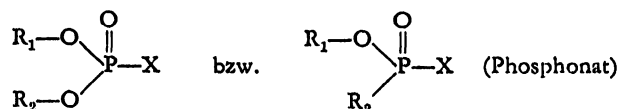
(Eingegangen am 16. Juni 1970)

Organophosphat-Inhibitoren stellen wichtige und vielseitige Hilfsmittel bei der Aufklärung der Struktur, des aktiven Zentrums und des Wirkungsmechanismus von Serinhydrolasen dar. Ihre Anwendung wird am Beispiel eigener Untersuchungen mit unspezifischen Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) aus Leber und Niere erläutert. Einige Eigenschaften des neuen und für Leber- und Nierenesterase spezifischen, anionischen Inhibitors Bis-(*p*-nitrophenyl)phosphat werden beschrieben.

### *Organophosphate inhibitors as tools for the enzymologist*

Organophosphate inhibitors represent an important and versatile means for the elucidation of the structure, the active centre and the mechanism of action of serine hydrolases. Their application is illustrated by studies with unspecific carboxylesterases (EC 3.1.1.1) from liver and kidney. Some properties of the new anionic inhibitor, bis-(*p*-nitrophenyl)phosphate, which is also specific for liver and kidney esterase, are described.

Seit jeher hat die Anwendung spezifischer Enzyminhibitoren Wesentliches zur Lösung biochemischer Probleme beigetragen. So konnten beispielsweise viele Einzelschritte und Zwischenprodukte von Stoffwechselketten (Glykolyse, Atmungskette, Citratcyclus, Proteinbiosynthese u. a.) durch Inhibitoren aufgeklärt werden. Darüber hinaus haben sich Hemmstoffe auch als wertvolle Hilfsmittel zum Studium des Mechanismus der enzymatischen Katalyse erwiesen. Dies gilt besonders für die Gruppe der sog. „Organophosphat“-Inhibitoren, mit deren Hilfe wertvolle Informationen über den Wirkungsmechanismus und das aktive Zentrum bestimmter Hydrolasen gewonnen werden konnten. Dabei handelt es sich um organische Phosphorsäureester, deren allgemeine Struktur wie folgt angegeben werden kann:



Bei X handelt es sich um die sog. „leaving group“, die bei der Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym abgespalten wird. Das kann z. B. ein *p*-Nitrophenylrest sein, wie beim E 600 (Diäthyl-*p*-nitrophenylphosphat) oder ein Fluoratom, wie beim DFP (Diisopropylfluorophosphat). Der Phosphatrest mit den anderen beiden Gruppen (R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>) wird auf das Enzym übertragen und dort fest, häufig sogar irreversibel gebunden (s. u.). Die vorliegende Arbeit bringt eine Übersicht über die Anwendung von Organophosphat-Inhibitoren als viel-

seitige Hilfsmittel bei der Aufklärung der Struktur und Wirkungsweise hochgereinigter unspezifischer Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) aus Leber und Niere.

### Serinhydrolasen

Welche Enzyme werden durch Organophosphat-Inhibitoren gehemmt? Wie Tabelle 1 zeigt, handelt es sich

Tab. 1  
Durch Organophosphat-Inhibitoren hemmbare Enzyme aus der Gruppe der „Serinhydrolasen“

Enzyme	Ordnungsnummer (Enzyme Commission)
A. Endopeptidasen	
Trypsin	EC 3.4.4.4
Chymotrypsin	EC 3.4.4.5
Pancreatoelastase E (Elastase)	EC 3.4.4.7
Thrombin	EC 3.4.4.13
Subtiloelastase A (Subtilisin)	EC 3.4.4.16
B. Carboxylesterasen	
Acetylcholinesterase	EC 3.1.1.7
(Pseudo)cholinesterase	EC 3.1.1.8
unspezif. Carboxylesterase	EC 3.1.1.1

dabei in erster Linie um Endopeptidasen und Esterasen. Wegen der Beteiligung eines Serinrestes am aktiven Zentrum (s. u.) werden diese Enzyme auch als Serinhydrolasen zusammengefaßt. Das Verhalten gegen Organophosphat-Inhibitoren ermöglicht eine erste proteochemische Klassifizierung von Hydrolasen. So lassen sich proteolytische Enzyme beispielsweise in Serinhydrolasen, SH-Enzyme und Metallproteide einteilen. Das  $\alpha$ -Chymotrypsin gehört heute zu den hinsichtlich Struktur (Sequenz, Röntgenstrukturanalyse) und Wirkungsmechanismus am besten untersuchten Enzymen

<sup>1)</sup> Nach Vorträgen vor der Medizinischen Gesellschaft Kiel (23. 4. 1970) und an der Freien Universität Berlin (29. 5. 1970).

überhaupt. — Bei den Carboxylesterasen im engeren Sinne unterscheidet man zwischen sog. A-Esterasen, die durch Organophosphate, wie DFP und E 600, nicht gehemmt werden, diese aber als Substrate spalten können. Solche A-Esterasen sind z. B. im Serum nachgewiesen worden (1). Die durch Organophosphate hemmbaren Esterasen werden demgegenüber als B-Esterasen bezeichnet. Sie kommen im Serum, aber auch in verschiedenen Organen, z. B. Leber und Niere, vor. In Schweinenieren wurde ferner eine Esterase gefunden, die durch Organophosphate weder gehemmt wird, noch diese hydrolysiert und die daher C-Esterase genannt wurde (2). — Auf die Acetylcholinesterase, ein Enzym von großem physiologischem und pharmakologischem Interesse, dessen Blockierung die Ursache der außerordentlich hohen Toxizität der organischen Phosphorsäureester ist, wird hier bewußt nicht eingegangen.

### Unspezifische Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1)

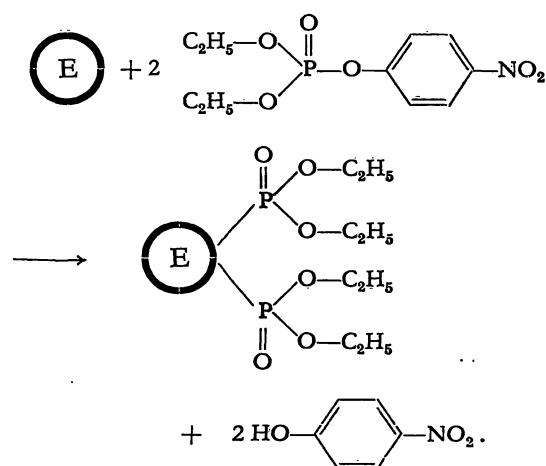
Unsere Untersuchungen begannen 1963 mit der Beobachtung, daß eine hochgereinigte Säureamidase aus Schweinelebermikrosomen bereits durch sehr kleine Konzentrationen (1–10  $\mu\text{M}$ ) E 600 und DFP vollständig gehemmt wurde. Bei der näheren Untersuchung der Substratspezifität des Enzyms stellte sich heraus, daß nicht nur bestimmte aromatische Säureamide (z. B. Acetanilid, Phenacetin, Xylocain, Hostacain u. a.) hydrolysiert wurden, sondern auch eine große Anzahl von Carboxylestern, und zwar mit wesentlich höheren Wechselzahlen (3). Weitere Untersuchungen machten wahrscheinlich, daß beide Funktionen (Spaltung von Amid und Ester) auf das gleiche Enzymprotein zurückzuführen sind. Es lag daher nahe, eine Identität der von uns isolierten „Acetanilid-Säureamidase“ mit der unspezifischen Leberesterase (EC 3.1.1.1; früher auch als Ali-Esterase bezeichnet) anzunehmen. Immerhin mußte ausgeschlossen werden, daß unsere Präparation aus einem Gemisch zweier ähnlicher Enzyme, einer Amidase und einer Esterase, bestand. Hierzu wurde das Enzym zunächst auf seine Einheitlichkeit geprüft. Mit verschiedenen Methoden (Ultrazentrifugation (3,4), Stärkegel- und Diskelektrophorese (5,6), Immundiffusion und Immunelektrophorese (7) u. a.) konnte bisher stets nur eine einzige Proteinbande nachgewiesen werden.

### Bestimmungen des Äquivalentgewichtes

Wie im folgenden gezeigt wird, ermöglicht die Anwendung von Organophosphat-Inhibitoren auch Aussagen über das Molekulargewicht und die Reinheit von Enzympräparationen. Seit den Versuchen von JANSEN

und Mitarbeitern (8) am Chymotrypsin ist bekannt, daß die Reaktion von Serinhydrolasen mit Organophosphat-Inhibitoren stöchiometrisch verläuft und die Hemmung dann 100% erreicht, wenn ein Mol  $\text{DF}^{32}\text{P}$  mit einem Mol Enzym reagiert hat. Dabei kann beispielsweise die Bindung von  $^{32}\text{P}$  an das Enzym (8, 9) oder, beim E 600, die Freisetzung von *p*-Nitrophenol (10) als Meßgröße dienen. Auf diese Weise kann das Äquivalentgewicht eines Enzyms ermittelt werden, worunter die Gramm-Menge Enzymprotein zu verstehen ist, die auf ein Mol aktive Zentren entfällt. Einige auf diese Weise enthaltene Äquivalentgewichte von Carboxylesterasen sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Eine entscheidende Voraussetzung ist dabei die Reinheit der verwendeten Enzympräparation. So ist das erste seinerzeit von BOURSNELL und WEBB (9) bestimmte Äquivalentgewicht der Pferdeleberesterase zweifellos zu hoch, da die eingesetzte Enzympräparation noch etwa 20% Fremdprotein enthielt. Da dieses nicht mit dem Inhibitor reagiert, wird mehr Protein zur Reaktion mit einem Mol des Hemmstoffes benötigt und man erhält einen zu hohen Wert. Mit zunehmender Reinheit einer Esterasepräparation sinkt das Äquivalentgewicht bis auf einen konstanten Endwert von etwa 80 000 ab. Liegt der gefundene Wert höher, so spricht dies für eine Verunreinigung mit Fremdproteinen.

Offenbar haben Esterasen verschiedener Herkunft im Rahmen der methodischen Fehlerbreite gleiche Äquivalent- und Molekulargewichte. Die Werte anderer Arbeitsgruppen stimmen mit denen von uns recht gut überein (Tab. 2). Man erkennt, daß das Äquivalentgewicht unspezifischer Carboxylesterasen halb so groß wie das Molekulargewicht ist. Hieraus folgt, daß das Enzym zwei aktive Zentren besitzt. Die Stöchiometrie der Reaktion mit E 600 kann daher durch folgende Gleichung wiedergegeben werden:



Tab. 2  
Bestimmung des Äquivalentgewichtes von unspezifischen Esterasen (EC 3.1.1.1) mit Organophosphat-Inhibitoren

Autoren	Organ	Inhibitor	Äquivalentgew.	Mol.gew.
BOURNELL u. WEBB (9)	Pferdeleber	$\text{DF}^{32}\text{P}$	96 000	—
KRISCH und Mitarbeiter (4, 11, 12)	Schweineleber	E 600	86 000	166 000
HORGAN, WEBB u. ZERNER (13)	Schweineleber	E 600	78 000	163 000
BARKER u. JENCKS (14)	Schweineleber	?	78 200	168 000
BENÖHR u. KRISCH (15)	Rinderleber	E 600	78–83 000	168 000
FRANZ u. KRISCH (5)	Schweineniere	E 600	80 000	162 000

Das Vorliegen von zwei aktiven Zentren findet seine Erklärung darin, daß Schweineleberesterase aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist und normalerweise, d. h. bei höheren Proteinkonzentrationen ( $< 1 \text{ mg/ml}$ ), als Dimer vorliegt (14). Die Quartärstruktur der Rinderleberesterase ist dagegen zur Zeit noch umstritten (15, 16, 17, 18). So nimmt ECOBICHON (18) hier einen Aufbau aus 3 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 55000 an.

#### Reaktivierung von phosphorylierter Schweineleberesterase

In vielen Fällen ist die Reaktion von Serinhydrolasen mit Organophosphat-Inhibitoren irreversibel. Dies hängt allerdings in jedem Fall vom Enzym und der Art des Inhibitors ab. Meist werden diejenigen Organophosphate, die am schnellsten mit dem Enzym reagieren, auch mit der größten Geschwindigkeit nicht-enzymatisch durch Hydrolyse wieder abgespalten (19). — Nach Umsetzung von Schweineleberesterase mit einem Überschuß von E 600 beobachteten wir — nach einer sehr schnellen initialen stöchiometrischen Reaktion („initial burst“ 10, 13) — eine langsame weitere Freisetzung von *p*-Nitrophenol (11). Diese zeigt, daß ein echter, wenn auch außerordentlich langsamer ( $3,6 \text{ mMol E 600/Min} \cdot \text{Mol Enzym}$ ) Umsatz des Inhibitors erfolgt. Demzufolge läßt sich die durch eine stöchiometrische Menge E 600 gehemmte Esterase auch reaktivieren. Diese Reaktivierung beruht auf einer Hydrolyse des phosphorylierten Enzyms und folgt einer Reaktionskinetik 1. Ordnung (Halbwertszeit 330 Min; Geschwindigkeitskonstante  $2,1 \times 10^{-3} \text{ Min}^{-1}$  (13)). Sie wird durch Reaktivatoren der Acetylcholinesterase (Pralidoxim = PAM, Obidoxim) nicht beschleunigt.

#### Titration der aktiven Zentren

Wie bereits beschrieben, kann mit Hilfe von Organophosphat-Inhibitoren die Normalität von Enzymlösungen, d. h. die Konzentration der vorliegenden aktiven Zentren direkt bestimmt werden, — bei Verwendung von E 600 in der Regel durch Auswertung der durch den „initial burst“ (10, 13) freigesetzten Menge *p*-Nitrophenol. Bei Einsatz stöchiometrischer Mengen des Inhibitors und gleichzeitiger Durchführung von Aktivitätsbestimmungen kann aber auch die Frage geklärt werden, ob zwei verschiedene Substrate am gleichen aktiven Zentrum umgesetzt werden. So wurde auf Grund der Parallelität der beiden Hemmkurven bewiesen, daß Proteolyse und Esterspaltung (Substrat *L*-Tyrosinäthylester) durch Chymotrypsin am gleichen aktiven Zentrum erfolgen (8, 10).

Die gleiche Frage stellte sich auch im Verlauf unserer Untersuchungen mit Carboxylesterasen, bei denen zu prüfen war, ob die Spaltung von Säureamiden und Carboxylestern tatsächlich durch das gleiche aktive Zentrum katalysiert wird. Abbildung 1 zeigt das Ergebnis eines Versuches, bei dem Schweineleberesterase durch Zusatz kleiner Mengen E 600 titriert wurde. Hierbei liegt das Enzym zunächst im Überschuß vor. Aufge-

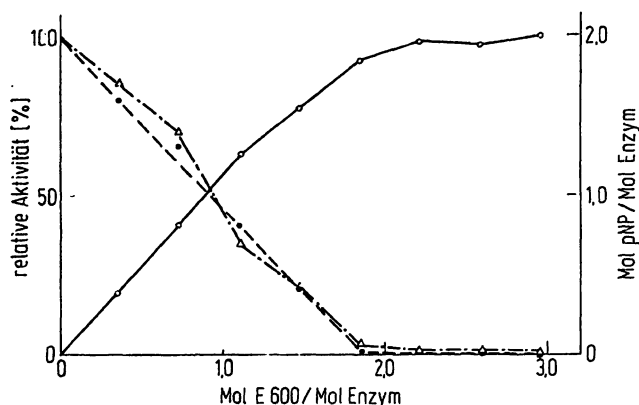


Abb. 1  
Titration von Schweineleberesterase mit E 600. Vergleich der Freisetzung von *p*-Nitrophenol (pNP  $\circ$ — $\circ$ ) mit den Aktivitäten gegen Acetanilid ( $\Delta$ — $\cdot$ — $\Delta$ ) und Procain ( $\bullet$ — $\bullet$ ) nach KRISCH (11)

tragen sind die Endwerte der initialen Freisetzung von *p*-Nitrophenol gegen die zugesetzte Menge E 600, beide bezogen auf 1 Mol Enzym. Man erkennt, daß pro Mol E 600 1 Mol *p*-Nitrophenol freigesetzt wird, — ein Beweis, daß der zugesetzte Inhibitor quantitativ an das Enzym gebunden wird. Bei einem Molverhältnis von 2:1 ist das Enzym zu Ende titriert und die Kurve knickt ab. Dies bestätigt noch einmal das Vorliegen von zwei aktiven Zentren. Gleichzeitig wurden die Aktivitäten gegen die beiden Substrate Acetanilid (Säureamid) und Procain (Ester) bestimmt. Ihre relativen Aktivitäten in % sind auf die Ordinate (Abb. 1) aufgetragen. Mit zunehmender Zugabe von E 600 nehmen beide Aktivitäten immer mehr ab und erreichen, wie zu erwarten, bei einem Molverhältnis von 2:1 gerade Null. Aus der Übereinstimmung der beiden Aktivitätskurven kann gefolgert werden, daß die beiden Substrate nicht nur vom gleichen Enzym, sondern auch vom gleichen aktiven Zentrum umgesetzt werden (11). — Dies wurde kürzlich auch durch kinetische Untersuchungen bestätigt, bei denen geprüft wurde, ob sich die beiden Substratgruppen gegenseitig kompetitiv hemmen. Es konnte in gemeinsamen Untersuchungen mit ECKERT und REIMANN (20) an Schweineleberesterase gezeigt werden, daß die enzymatische Hydrolyse von Essigsäureäthylester durch das Säureamid *N*-Butylaminoessigsäure-2-chlor-6-methylanilid  $\cdot$  HCl (Hostacain) kompetitiv gehemmt wird und umgekehrt.

#### Isolierung von Peptiden aus dem aktiven Zentrum

Auf Grund der festen Bindung ist eine Markierung des aktiven Zentrums von Serinhydrolasen durch  $^{32}\text{P}$ -markierte Organophosphat-Inhibitoren möglich. Nach anschließender Inkubation des phosphorylierten Enzyms mit Pepsin-HCl oder anderen proteolytischen Enzymen können die entstandenen Spaltpeptide durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration getrennt werden. Ein Beispiel hierfür gibt Abbildung 2. Sie zeigt das Elutionsdiagramm einer Säulenchromatographie (Dowex XW 50) nach Pepsin-HCl-Hydrolyse von  $\text{DF}^{32}\text{P}$ -markierter Schweineleberesterase. Das aus dem aktiven Zentrum stammende Peptid läßt sich unschwer auf

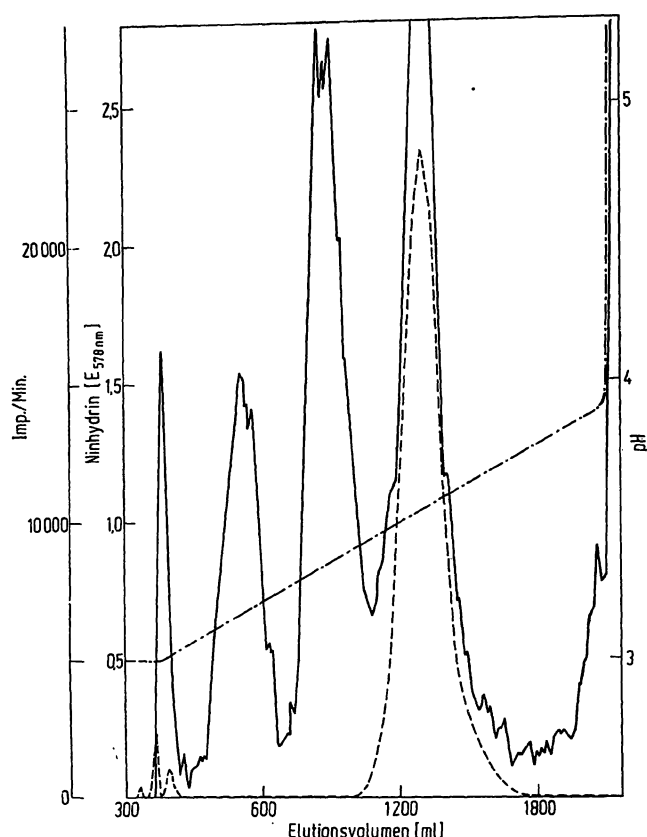


Abb. 2

Ionenaustauschchromatographie von Spaltpeptiden nach Pepsin/HCl-Hydrolyse von DF<sup>32</sup>P-markierter Schweineleberesterase an DOWEX XW 50. Elution durch pH-Gradient. — Peptidkonzentration (Ninhydrinreaktion), — Radioaktivität (<sup>32</sup>P), — pH [nach HEYMANN, KRISCH und PAHLICH (24)]

Grund seiner Radioaktivität identifizieren. Nach weiterer Reinigung kann dann anschließend die Aminosäuresequenz dieses Peptides mit den üblichen Methoden der Proteinchemie (EDMAN-Abbau, Dinitrophenylierung, Behandlung mit Carboxypeptidase u. a.) ermittelt werden. In Tabelle 3 sind die von drei Arbeitsgruppen gefundenen Sequenzen von Oktapeptiden aus dem aktiven Zentrum von Leber- und Nierenesterasen verschiedener Herkunft wiedergegeben.

In allen bisher bekannten Fällen ist der Phosphatrest des Inhibitors kovalent an die  $\beta$ -Hydroxylgruppe eines Serinrestes gebunden. Dies führte dann zur Prägung des Begriffes „Serin-Hydrolasen“ (s. o.). Die hohe Reaktivität dieses einen Serinrestes — Chymotrypsin enthält insgesamt 29, Schweineleberesterase sogar 78 Serinreste! (12) — muß durch eine besondere räumliche Konformation im aktiven Zentrum bedingt sein, denn inaktive Zymogene, wie  $\alpha$ -Chymotrypsinogen, denaturierte Enzyme und Spaltpeptide reagieren nicht mit

Organophosphat-Inhibitoren. Außer dem Serin ist bei den Endopeptidasen noch ein Histidinrest im aktiven Zentrum nachgewiesen worden. Dieser hat beim Chymotrypsin die Position 57 in der Sequenz und kann hier durch den spezifischen Inhibitor <sup>14</sup>C-L-1-Tosylamido-2-phenyl-äthyl-chlormethylketon (TPCK) alkyliert und identifiziert werden (21). Bei den unspezifischen Carboxylesterasen steht der unmittelbare Beweis einer Beteiligung von Histiden am aktiven Zentrum dagegen vorerst noch aus (6).

Sequenzbestimmungen von durch Organophosphat-Inhibitoren markierten Peptiden aus dem aktiven Zentrum wurden zunächst vorwiegend an Endopeptidasen durchgeführt. Bei diesen findet sich N-terminalwärts vom „aktiven Serin“ stets ein Asparginsäurerest. Bei den Carboxylesterasen wurde stattdessen ein Glutaminsäurerest gefunden (Tab. 3).

#### Immunologische Studien mit phosphorylierten Enzymderivaten

Auch zur Klärung immunologischer Fragen können Organophosphat-Inhibitoren wertvolle Hilfsmittel darstellen. So kann man beispielsweise die Beziehungen zwischen dem aktiven Zentrum von Serinhydrolasen und den für die Bildung des Immunpräzipitates verantwortlichen Gruppen untersuchen. Einen einfachen qualitativen Versuch hierzu zeigt Abbildung 3. Dabei ließen wir im OUCHTERLONY-Test Schweineleberesterase gegen ein homologes Antiserum vom Kaninchen diffundieren. Wie zu erwarten, kommt es zur Ausfällung eines Immunpräzipitates in Form einer scharfen einheitlichen Bande. Blockierung des aktiven Zentrums mit E 600

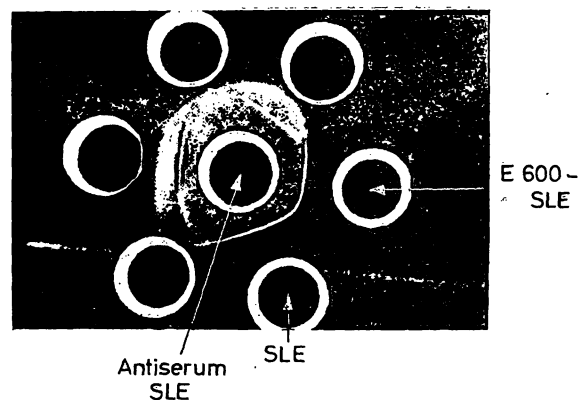


Abb. 3

Reaktion von Schweineleberesterase (SLE) und durch E 600 phosphorylierte Esterase (E 600-SLE) mit homologem Antiserum (Mitte) vom Kaninchen (OUCHTERLONY-Test). Die übrigen 4 peripheren Löcher (links und oben) enthalten andere Antigene; sie sind in diesem Zusammenhang ohne Interesse. (HAIN und KRISCH, unveröffentlicht)

Tab. 3  
Sequenz von Peptiden aus dem aktiven Zentrum von Carboxylesterasen aus Leber und Niere

Esterase aus	Sequenz im aktiven Zentrum	Autoren
Pferdeleber	Gly-Glu-Ser(P)-Ala-Gly-Gly-(Glu, Ser)	JANSZ und Mitarbeiter (22)
Rinderleber	Gly-Glu-Ser(P)-Ala-Gly-Ala-Glu-Ser	WEBB und Mitarbeiter (23)
Hühnerleber	Gly-Glu-Ser(P)-Ala-Gly-Gly-Ile-Ser	WEBB und Mitarbeiter (23)
Schafsleber	Gly-Glu-Ser(P)-(Ala, Gly, Gly, Glu)-Ser	WEBB und Mitarbeiter (23)
Schweineleber	Gly-Glu-Ser(P)-(Ala, Gly, Gly, Glu)-Ser	WEBB und Mitarbeiter (23)
Schweineleber	Gly-Glu-Ser(P)-Ala-Gly- <sup>ASP</sup> -Gly-Ser	KRISCH und Mitarbeiter (24)
Schweineniere	Gly-Glu-Ser(P)-Ala-Gly- <sup>ASP</sup> -Gly-Ser	KRISCH und Mitarbeiter (24)

hat keinen Einfluß auf die Bildung des Immunpräzipitates. Man erhält eine gleich starke Linie, die ohne Unterbrechung oder Spornbildung mit der des ungehemmten Enzyms konfluiert. Hieraus kann gefolgert werden, daß das aktive Zentrum der Esterase offenbar keine wesentliche Rolle bei der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes spielt. In Übereinstimmung hiermit wurde gefunden, daß das Antigen-Antikörper-Präzipitat in diesem Fall noch enzymatisch aktiv ist (7). In ähnlichen, eingehenderen Untersuchungen stellte GUNDLACH (25) kürzlich beim Chymotrypsin fest, daß die Aktivität des Immunpräzipitates gegen Chloracetyl-Tyrosinäthylester im Vergleich zum freien Enzym nur teilweise gehemmt ist, während das hochmolekulare Casein, vermutlich durch sterische Behinderung, nicht mehr gespalten werden kann. Auf Grund quantitativer Immunpräparationskurven (nach HEIDELBERGER) nimmt GUNDLACH eine Konformationsänderung des Chymotrypsins durch die Bindung von DFP, vergleichbar einem „induced fit“ im Sinne KOSHLANDS (26), an.

Gibt es ein physiologisches Substrat für unspezifische Carboxylesterasen?

Die Frage, ob unspezifische Carboxylesterasen auch eine physiologische Funktion im Intermediärstoffwechsel haben, ist bis heute ungeklärt. Ihre Substratspezifität ist bemerkenswert gering. Es handelt sich bei allen bisher als Substraten bekannten Verbindungen um Fremdstoffe („foreign compounds“). Eine Reihe davon (Procain, Xylocain, Hostacain und Phenacetin) besitzen pharmakologisches Interesse. Möglicherweise haben die genannten unspezifischen Esterasen also nur die Funktion, körperfremde Verbindungen mit Carboxylester- und Säureamidbindungen hydrolytisch abzubauen.

Auch die Frage nach der physiologischen Rolle unspezifischer Esterasen wurde mit Organophosphat-Inhibitoren geprüft. Wegen ihrer hohen Toxizität sind Versuche am lebenden Tier hier jedoch schwierig durchzuführen. Es war die Frage, ob auch bei einer selektiven Blockierung z. B. der Leberesterase durch Organophosphat-Inhibitoren Stoffwechselstörungen auftreten und ob diese Verbindungen — abgesehen von der bekannten Blockierung der Acetylcholinesterase — isolierte cytotoxische Wirkungen haben, aus denen man auf die physiologische Funktion der gehemmten Organesterasen rückschließen könnte. Bereits 1953 studierten MYERS und MENDEL (27) den Sauerstoffverbrauch und die Bildung von Acetessigsäure aus „endogenen“ Fetten bzw. aus Butyrat in Rattenleberhomogenaten und -schnitten. Dabei fanden sich in Ansätzen mit E 600, DFP, Tetraäthylpyrophosphat oder Tri-*[o-kresyl]*phosphat, — trotz nahezu vollständiger Hemmung der Esteraseaktivität, — keine Unterschiede zu den Kontrollen. Die Autoren stellen daher zusammenfassend fest, daß es keine Anhaltspunkte für eine essentielle Funktion Organophosphat-empfindlicher Esterasen im normalen Fettstoffwechsel der Rattenleber gibt.

Immerhin kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß andere, von MYERS und MENDEL nicht erfaßte Stoff-

wechselschritte direkt oder indirekt Organophosphat-empfindlich sind. Wir haben daher diese Frage in Zusammenarbeit mit SCHIMASSEK (28) erneut aufgegriffen und den Einfluß von DFP und E 600 auf den Stoffwechsel der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht. Dabei wurden zahlreiche Substrate der Glykolyse<sup>2)</sup>, des Citratcyclus<sup>3)</sup>, des Fettstoffwechsels<sup>4)</sup>, sowie ATP, ADP, AMP und anorganisches Phosphat in der Leber bestimmt. Aber auch hier ergaben sich nach 60 Min Perfusion mit E 600 oder DFP bisher keine Abweichungen von den Normalwerten, die bei der Perfusion von Organophosphat-freien Kontroll-Lebern gefunden wurden. Zusätzlich zu den nach „Frierestopp“ in der Leber durchgeführten Substratbestimmungen wurde auch die Perfusionsflüssigkeit analysiert und zwar auf Harnstoff, Pyruvat, Lactat, anorganisches Phosphat und Glucose. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der „steady-state“-Konzentrationen im Verlauf einer 60 Min. Perfusionsperiode mit DFP. Kontrollbestimmungen zeigten, daß unter identischen Bedingungen die Esterase/Säureamidase-Aktivitäten in der Leber vollständig gehemmt waren.

Bis-*[p-nitrophenyl]*phosphat, — ein neuer, spezifischer Esterase-Inhibitor

Durch die typischen Organophosphat-Inhibitoren, wie E 600 und DFP, werden praktisch alle Serinhydrolasen gehemmt. Zum Studium einer möglichen physiologischen Funktion von Organesterasen wäre es wünschenswert, wenn Inhibitoren größerer Spezifität zur Verfügung stünden. Ein solcher Inhibitor der sog. „Ali-Esterasen“ mit nur geringer Hemmwirkung auf Cholinesterasen und vergleichsweise geringer Toxizität ist das schon lange bekannte Tri-*[o-kresyl]*phosphat (27, 29). Weitere ähnliche Organophosphat-Verbindungen, durchweg Phosphorsäure-Triester, wurden durch Untersuchungen von ALDRIDGE und BARNES (30) bekannt. —

Ein neuer, anionischer Esterase-Inhibitor, Bis-*[p-nitrophenyl]*phosphat, wurde kürzlich von uns entdeckt (31). Diese Verbindung hemmt nur unspezifische Carboxylesterasen (aus Schweineleber, Rinderleber und Schweinenieren), nicht jedoch Acetylcholinesterase, unspezifische Serumcholinesterase,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Trypsin. Bis-*[p-nitrophenyl]*phosphat reagiert, ebenso wie E 600, in vitro stöchiometrisch mit den von uns isolierten Carboxylesterasen. Dabei konnte noch einmal bestätigt werden, daß Schweineleberesterase zwei aktive Zentren besitzt. Der Inhibitor reagiert hier unter Abspaltung eines *p*-Nitrophenylrestes, d. h. monofunktionell. Wie erwähnt, blockiert Bis-*[p-nitrophenyl]*phosphat die Acetylcholinesterase nicht (31). Dies ist möglicherweise auf das Vorliegen einer freien anionischen Gruppe

<sup>2)</sup> Glucose, Glucose-6-phosphat, Fructose-1,6-diphosphat, Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat, Lactat; Glykogen.

<sup>3)</sup> Citrat, 2-Oxoglutarat, Malat.

<sup>4)</sup> Gesamtfette;  $\alpha$ -Glycerophosphat.

zurückzuführen, deren negative Ladung vom anionischen Zentrum der Acetylcholinesterase abgestoßen werden könnte. So berichteten AHARONI und O'BRIEN (32), daß die O-Desalkylierung von Organophosphat-Triestern zu einem drastischen Verlust der Anticholinesterase-Wirkung führt. Bemerkenswerterweise ist die akute Toxizität von Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat etwa 100mal geringer ( $LD_{50}$  bei der Maus 410 mg/kg), als die der typischen Organophosphate (31). Dieser Hemmstoff ist daher auch für in vivo-Versuche wesentlich besser geeignet.

#### Hemmung der Methämoglobinbildung nach Gabe acylierter aromatischer Amide durch Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat

Als Nebenwirkung nach Verabfolgung von hohen Dosen acylierter aromatischer Amide, wie Acetanilid und Phenacetin, kommt es zum Auftreten von Methämoglobin. Dazu muß das betreffende Säureamid zunächst zum freien Amin deacyliert werden. Dieses wird dann anschließend in einer NADPH- und  $O_2$ -abhängigen Reaktion N-hydroxyliert. Die entstehenden Phenylhydroxylamin- bzw. Nitrobenzolderivate sind die unmittelbaren Methämoglobinbildner. Wenn nun die Säureamidbindung des Acetanilid und des Phenacetins auch in vivo durch Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat-empfindliche Esterasen hydrolysiert wird, müßte auch die Methämoglobinbildung durch Vorbehandlung mit diesem Inhibitor gehemmt werden. Wie Abbildung 4 zeigt, ist dies bei der Ratte tatsächlich der Fall. Die Methämoglobinkonzentrationen nach Acetanilid (400 mg/kg i. p.) betragen bei gleichzeitig mit Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat behandelten Ratten nur etwa 18% im Vergleich zu den Methämoglobinwerten der Kontrollen, die nur Acetanilid erhalten hatten. Nach Gabe von Phenacetin wird eine ähnliche (allerdings schwächere) Hemmung der

Methämoglobinbildung beobachtet (33). Die nach Gabe von *p*-Phenetidin, dem entsprechenden freien Amin, auftretende Methämoglobinämie wird dagegen, wie zu erwarten, durch Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat nicht beeinflusst. Diese Untersuchungen wurden gemeinsam mit BÜCH und BUZZELLO vom Pharmakologischen Institut der Universität des Saarlandes durchgeführt.

#### Ermittlung des Turnovers von Serinhydrolasen mit Hilfe von Organophosphat-Inhibitoren

Wenn man annimmt, daß die Phosphorylierung einer Serinhydrolase auch in vivo irreversibel ist, d. h. keine hydrolytische Abspaltung des Phosphatrestes erfolgt, könnte das Wiederauftreten der Enzymaktivität nach einmaliger Gabe eines Organophosphat-Inhibitors ausschließlich auf eine de-novo-Synthese des Enzymproteins zurückgeführt werden. Dies wird meist stillschweigend vorausgesetzt. — Auch Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat reagiert in vitro irreversibel mit hochgereinigten Carboxylesterasen (31). Nach Injektion dieser Verbindung bei der Ratte (100 mg/kg i. p.) ist die Esteraseaktivität gegen Buttersäuremethylester und Monoäthylglycinoxylid 60 Min. später etwa zu 90% gehemmt (33). Daß die Spaltung der Säureamidbindung des Phenacetins unter gleichen Bedingungen nur um etwa 70% gehemmt ist, kann möglicherweise auf das Vorliegen einer zweiten, nicht Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat empfindlichen, Phenacetin-hydrolysierenden Amidase im Rattenleberhomogenat zurückgeführt werden (33). Es wurden nun, nach einmaliger Gabe des Inhibitors, täglich die Esterase/Amidase-Aktivitäten im Leberhomogenat bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Wie zu erwarten, steigen die Aktivitäten im Verlauf einiger Tage wieder langsam an. Die Halbwertszeit, bei der 50% der Ausgangsaktivität wieder erreicht sind, beträgt

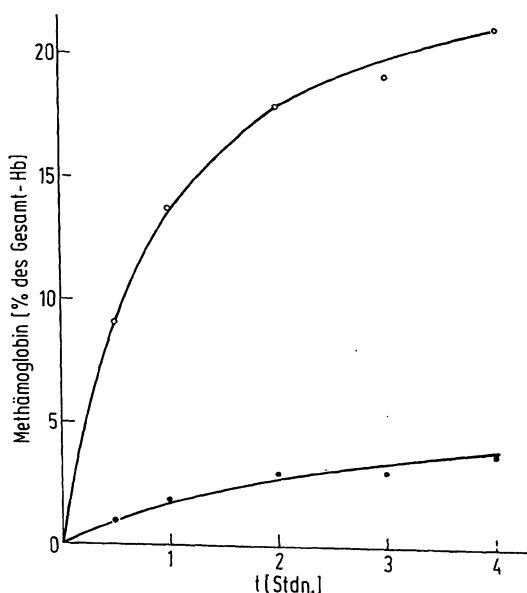


Abb. 4

Methämoglobin-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit nach 400 mg/kg Acetanilid i. p. (Kontrollen  $\circ$ — $\circ$ ) und nach gleichzeitiger Verabfolgung der gleichen Acetanilid-Dosis plus 50 mg/kg Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat i. v. ( $\bullet$ — $\bullet$ ) bei weiblichen Ratten. Mittelwerte von je 10 Tieren [nach HEYMANN und Mitarbeitern (33)]

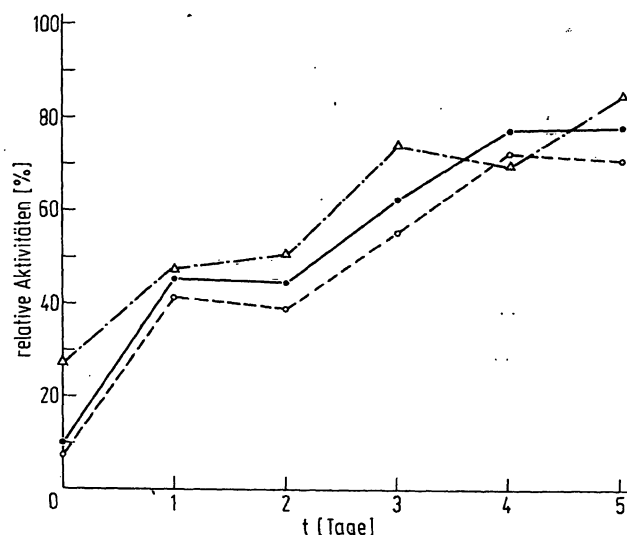


Abb. 5

Wiederanstieg der Esterase/Amidase-Aktivitäten im Rattenleberhomogenat gegen Buttersäure-Methylester ( $\bullet$ — $\bullet$ ), Monoäthylglycinoxylid ( $\circ$ — $\circ$ ) und Phenacetin ( $\Delta$ — $\Delta$ ) nach einmaliger Gabe von Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat (100 mg/kg i. p.). Mittelwerte von je 5 Tieren [nach (33)]

50—60 Stunden. Bis zur vollständigen Wiederherstellung der Aktivität vergehen etwa 6—7 Tage. Unter der zu Anfang des Abschnittes gemachten Prämisse entsprächen diese Zeiten dem physiologischen Turnover der Leberesterase.

Abschließend sei erwähnt, daß es uns auch mit Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat bisher noch nicht gelungen ist, Anhaltspunkte für eine physiologische Funktion unspezifischer Carboxylesterasen zu erhalten. Trotz weitgehender Blockierung ihrer Carboxylesterasen (75—80% Hemmung) bei bis zu 4 wöchiger Gabe von Bis-[*p*-

nitrophenyl]phosphat zeigten Ratten bisher stets normale Gewichtskurven und keine histologischen Veränderungen in Leber, Niere und Dünndarm im Vergleich zu Kontrolltieren. Diese Untersuchungen werden derzeit noch fortgesetzt, u. a. auch um zu klären, ob Bis-[*p*-nitrophenyl]phosphat bei chronischer Verabfolgung neurotoxische Wirkungen, vergleichbar denen des Tri-[*o*-kresyl]phosphat (30), besitzt.

Mein Dank gilt allen an den genannten Untersuchungen beteiligten Kollegen, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung unserer Arbeiten.

### Literatur

1. ALDRIDGE, W. N., *Biochem. J.* 53, 110, 117 (1953). — 2. BERGMANN, F., R. SEGAL und S. RIMON, *Biochem. J.* 67, 481 (1957). — 3. KRISCH, K., *Biochem. Z.* 337, 531, 546 (1963). — 4. BOGUTH, W., K. KRISCH und H. NIEMANN, *Biochem. Z.* 341, 149 (1965). — 5. FRANZ, W., und K. KRISCH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 349, 575 (1968). — 6. PAHLICH, E., K. KRISCH und K. BORNER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 350, 173 (1969). — 7. HAIN, P., und K. KRISCH, *diese Z.* 6, 313 (1968). — 8. JANSEN, E. F., M.-D. F. NUTTING und A. K. BALLS, *J. biol. Chemistry* 179, 189, 201 (1949). — 9. BOURSNEILL, J. H., und E. C. WEBB, *Nature (London)* 164, 875 (1949). — 10. HARTLEY, B. S., und B. A. KILBY, *Biochem. J.* 50, 672 (1952). — 11. KRISCH, K., *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 122, 265 (1966). — 12. KLAPP, B., K. KRISCH und K. BORNER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 351, 81 (1970). — 13. HÖRGAN, D. J., E. C. WEBB und B. ZERNER, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 23, 18, 23 (1966). — 14. BARKER, D., und W. P. JENCKS, *Federation Proc.* 26, 452 (1967); *Biochemistry USA* 8, 3879 (1969). — 15. BENÖHR, H. C., und K. KRISCH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 348, 1102, 1115 (1967). — 16. RUNNEGAR, M. T. C., K. SCOTT, E. C. WEBB und B. ZERNER, *Biochemistry USA* 8, 2013 (1969). — 17. RUNNEGAR, M. T. C., E. C. WEBB und B. ZERNER, *Biochemistry USA* 8, 2018 (1969). — 18. ECOBICHON, D. J., *Canad. J. Biochem.* 47, 799 (1969). — 19. ALDRIDGE, W. N., und A. N. DAVISON, *Biochem. J.* 52, 663 (1952). — 20. REIMANN, I. *Dissertation Math.-nat. Fakultät Münster* (1969). — 21. SCHOELLMANN, G., und E. SHAW, *Biochemistry USA* 2, 252 (1963). — 22. JANSZ, H. S., C. H. POSTHUMUS und J. A. COHEN, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 33, 396 (1959). — 23. AUGUSTEYN, R. C., J. DE JERSEY, E. C. WEBB und B. ZERNER, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 171, 128 (1969). — 24. HEYMANN, E., K. KRISCH und E. PAHLICH, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 351, 931 (1970). — 25. GUNDLACH, H. G., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 351, 690, 696, 701 (1970). — 26. KOSHLAND, D. E. jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* 44, 98 (1958). — 27. MYERS, D. K., und B. MENDEL, *Biochem. J.* 53, 16 (1953). — 28. SCHIMASSEK, H., und K. KRISCH, unveröffentlichte Versuche. — 29. SMITH, M. I., E. W. ENGEL und E. F. STOHLMANN, *U. S. Nat. Inst. Health Bull. No. 60*. — 30. ALDRIDGE, W. N., und I. M. BARNES, *Biochem. Pharmacol.* 15, 541, 549 (1966). — 31. HEYMANN, E., und K. KRISCH, *Z. physiol. Chem.* 348, 609 (1967). — 32. AHARONI, A. H., und R. D. O'BRIEN, *Biochemistry USA* 7, 1538 (1968). — 33. HEYMANN, E., K. KRISCH, H. BÜCH und W. BUZZELLO, *Biochem. Pharmacol.* 18, 801 (1969).

Prof. Dr. K. Krisch  
23 Kiel  
Olshausenstr. 40—60  
Otto-Meyerhof-Haus